

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation<sup>6</sup> : <b>C12N 7/02 // 15/86, A61K 48/00</b></p>		A1	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 98/39420</b></p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: <b>11. September 1998 (11.09.98)</b></p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/EP98/01257</b></p>		<p>(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p>	
<p>(22) Internationales Anmeldedatum: <b>5. März 1998 (05.03.98)</b></p>		<p><b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Mit geänderten Ansprüchen.</i></p>	
<p>(30) Prioritätsdaten: <b>197 09 186.5 6. März 1997 (06.03.97) DE</b></p>			
<p>(71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>): <b>MEDIGENE AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Lochhamer Strasse 11, D-82152 Martinsried (DE)</b></p>			
<p>(72) Erfinder; und</p>			
<p>(75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): <b>BOGEDAIN, Christoph [DE/DE]; Gabelsbergerstrasse 48c, D-80333 München (DE). MAASS, Gerhard [DE/DE]; Mitterweg 17, D-82402 Sindelsdorf (DE). HÖRER, Markus [DE/DE]; Inniger Strasse 9, D-81379 München (DE).</b></p>			
<p>(74) Anwälte: <b>DOST, Wolfgang usw.; Galileiplatz 1, D-81679 München (DE).</b></p>			
<p>(54) Title: <b>FILTRATION METHOD FOR SEPARATING VIRUSES</b></p>			
<p>(54) Bezeichnung: <b>FILTRATIONSVERFAHREN ZUR TRENNUNG VON VIREN</b></p>			
<p>(57) Abstract</p>			
<p>The invention relates to a filtration method for separating viruses of various sizes, wherein the solution containing said viruses is preferably filtered by one or several filtering membranes.</p>			
<p>(57) Zusammenfassung</p>			
<p>Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Trennung von Viren unterschiedlicher Größe, wobei die Virus-enthaltende Lösung vorzugsweise über eine oder mehrere Filtermembranen filtriert wird.</p>			

***LEDIGLICH ZUR INFORMATION***

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänen		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

5

## Filtrationsverfahren zur Trennung von Viren

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Trennung von Viren unterschiedlicher Größe, wobei die Virus-enthaltende Lösung vorzugsweise über eine oder mehrere Filtermembranen filtriert wird.

10

Das ursprüngliche Ziel der Gentherapie war es, genetische Erkrankungen durch geeignete genetische Veränderungen von Körperzellen zu heilen. Heutzutage wird der Begriff Gentherapie auf genetisch veränderte Zellen ausgedehnt, die auch für die Heilung von nicht genetisch bedingten Erkrankungen, wie beispielsweise virale Erkrankungen, therapeutisch eingesetzt werden können.

Für die genetische Veränderung von therapeutisch wirksamen Zellen sind geeignete Verfahren zur Übertragung der Nukleinsäure, DNA oder RNA, notwendig, die die genetische Veränderung der Zelle verursachen. Die zu übertragenen Nukleinsäuren werden häufig auch als sogenannte Transgene bezeichnet, selbst wenn sie nicht die Funktionen eines Gens ausüben, z. B. anti-sense Nukleinsäuren. Neben dem direkten Gentransfer von sogenannten nackten Nukleinsäuren haben sich auch genetisch veränderte Viren für den Gentransfer als geeignet erwiesen. Zur Zeit werden u. a. Retroviren, Adenoviren oder Adeno-assoziierte Viren (AAV) genetisch verändert, damit sie als Träger (viraler Vektor) des oder der Transgene für den Gentransfer verwendet werden können. Ein wesentlicher Gesichtspunkt bei der Entwicklung geeigneter viraler Vektoren sind Sicherheitsaspekte bei der Anwendung dieser Vektoren in der Gentherapie. Daher werden im allgemeinen replikationsdefiziente Viren entwickelt, also Viren, die zwar eine Zelle befallen und das

oder die Transgene auf die Zelle übertragen können, sich in dieser Zelle jedoch nicht selbst vermehren können. Dies wird beispielsweise dadurch erreicht, daß man für die Virusvermehrung wichtige Gene, beispielsweise die für Strukturproteine kodierenden Gene, deletiert und gegebenenfalls an deren 5 Stelle das oder die Transgene einbaut. Bei der Herstellung größerer für die gentherapeutische Verwendung geeigneter Mengen von nicht vermehrungsfähigen Viren sind sogenannte Helferviren notwendig, die den Defekt bei einem nicht vermehrungsfähigen Virus in der Zelle kompensieren. Die folgenden Beispiele zu retroviralen Vektoren und Adeno-assoziierten Vektoren 10 sollen das allgemeine Prinzip näher erläutern:

Replikationsdefiziente retrovirale Vektoren leiten sich von Wildtyp-Retroviren ab, die eine eigene Familie von eukaryotischen Viren darstellen, deren 15 genetisches Material (Strukturgene und regulatorische Gene) aus einzelsträngiger RNA besteht. Die Viren bestehen aus sphärischen, umhüllten Viruspartikeln mit einem Durchmesser von ca. 80-120 nm und einer inneren Kapsel, die zwei Kopien der genomischen RNA in Form eines Ribonucleoproteins enthält. Für die Herstellung retroviraler Vektoren werden beispielsweise ein oder mehrere Strukturgene (gag, pol und/oder env) durch das oder 20 die Transgene ersetzt. Die am 5'- und am 3'-Ende noch vorhandenen LTR-Regionen ("long terminal repeats") enthalten als cis-aktive Elemente regulatorische Sequenzen, wie z. B. einen Promotor, Polyadenylierungssignale und für die genomische Integration notwendige Sequenzen. Der retrovirale Vektor kann daher lediglich die LTR-Regionen enthalten, die das oder die Trans- 25 gene begrenzen. Für die Vermehrung eines replikationsdefizienten retroviralen Vektors wird daher beispielsweise ein Helfervirus, das ein oder mehrere der oben genannten retroviralen Strukturgene enthält, benötigt und so das oder die deletierten Strukturgene komplementiert (Whartenby, K. A. et al. (1995) Pharmac. Ther., 66, 175-190).

Replikationsdefiziente Adeno-assoziierte Virusvektoren leiten sich vom Wildtyp-AAV ab, das ein nicht-autonom replizierender Vertreter der Parvoviren ist und einen einzelsträngigen DNA Virus mit einem Durchmesser von ca. 25 nm darstellt. Bis heute kann man die serologisch unterschiedlichen Typen 5 AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4 und AAV-5 unterscheiden. AAV-Viren können entweder in das Genom der Wirtszelle integrieren oder in Anwesenheit eines Helfervirus in den Wirtszellen replizieren. Als mögliche Helferviren wurden zuerst Adenoviren gefunden. Adenoviren bilden beispielsweise in Vertebraten eine Gruppe von mehr als 80 serologisch unterscheidbaren Serotypen und enthalten eine äußere, idosaederförmige Proteinhülle (Capsid) und einen inneren DNA-Protein-Zentralkörper (Core). Das Capsid ist wiederum aus 252 Untereinheiten, sogenannte Capsomere, zusammengesetzt. Die Adenoviren besitzen im allgemeinen einen Durchmesser von ca. 70-90 nm und enthalten eine doppelsträngige, lineare DNA als genetisches Material, an 10 deren 5'- und 3'-Enden ITR-Regionen ("inverted terminal repeats") sitzen. Die Replikation von AAV (lytische Phase) benötigt nun insbesondere die Expression früher adenoviraler Gene, wie z. B. das E1a-, E1b-, E2a- und E4-Gen und die VA-RNA (Kotin, R. M. (1994) Human Gene Therapy, 5, 793-801). Es eignen sich jedoch auch andere Helferviren, wie z. B. Herpesviren, eine Gruppe human- und tierpathogener doppelsträngiger DNA-Viren 15 mit einem Durchmesser von ca. 120-200 nm, wobei das Capsid eine Ikosaederstruktur aufweist und aus 162 Capsomeren aufgebaut ist. Die Herpesviren lassen sich in drei Unterfamilien unterteilen, wobei zu den Alphaherpesvirinae z. B. Herpes simplex-Viren (HSV) Typ 1 und Typ 2 gehören, zu den 20 Betaherpesvirinae z. B. das Cytomegalievirus (CMV) und zu den Gammaherpesvirinae z. B. das Epstein-Barr-Virus (EBV).

Analog den retrovirusalen Vektoren können für die Herstellung Adeno-assozierter Vektoren beispielsweise ein oder mehrere für die Replikation notwendige rep-Gene (z. B. rep 40, rep 52, rep 68 und/oder rep 78) oder die für 25

die Capsidstruktur notwendigen cap-Gene (z. B. VP-1, VP-2 und/oder VP-3) durch das oder die Transgene ersetzt werden. Die am 5'- und am 3'-Ende noch vorhandenen ITR-Regionen sind als cis-aktive Elemente zur Verpackung des Transgens in infektiöse rekombinante AAV-Partikel sowie für die DNA-  
5 Replikation des rekombinanten AAV-Genoms erforderlich (Kotin, R. M. (1994), *supra*).

Ein vorteilhaftes Verfahren zur Herstellung größerer Mengen an rekombinanten AAV-Partikeln ist die Kotransfektion einer eukaryotischen Zelle mit  
10 zwei rekombinanten AAV-Plasmiden und einem Helfervirus (Chiorini, J. A. et al. (1995) *Human Gene Therapy*, 6, 1531-1541). Der erste rekombinante AAV-Vektor enthält das oder die Transgene, welche von den beiden ITR-Regionen begrenzt werden. Das zweite rekombinante AAV-Plasmid enthält die AAV-Gene, die für die Herstellung der Partikel benötigt werden (rep- und cap-Gene). Das Fehlen funktioneller ITR-Regionen im zweiten Vektor verhindert die Verpackung der rep- und cap-Gene in AAV-Partikel und damit die Entstehung von unerwünschtem Wildtyp-AAV. Anschließend werden Säugerzellen, beispielsweise COS-7 Zellen, die sowohl für die rekombinanten AAV-Vektoren als auch für das Helfervirus, beispielsweise  
20 Adenovirus, permissiv sind, d.h. die Voraussetzungen zur Infektion und zur Replikation bieten, mit den beiden rekombinanten AAV-Vektoren und dem Helfervirus transfiziert. Als Helfervirus ist insbesondere das Adenovirus geeignet, da es ein breites Spektrum von Zielzellen infizieren und in den Zellen selbst replizieren kann. Bei der Kultivierung der transfizierten Zellen  
25 erfolgt die Expression der AAV-Nichtstrukturproteingene, der AAV-Strukturproteingene, die Replikation von Transgen-DNA und die Verpackung und der Zusammenbau der rekombinanten AAV-Partikel (rAAV-Partikel). Die rAAV-Partikel enthalten das oder die Transgene, beidseitig flankiert von den ITR-Regionen, in Form einzelsträngiger DNA. Gleichzeitig repliziert das Helfer-  
30 virus in diesen Zellen, was bei Adenoviren als Helferviren nach einigen

Tagen im allgemeinen mit der Lyse und dem Tod der infizierten Zellen endet. Die entstandenen Viren (Adenoviren und rAAV-Partikel) werden hierbei teilweise in den Zellkulturüberstand freigesetzt oder verbleiben in den lysierten Zellen. Daher werden im allgemeinen für eine im wesentlichen

5 vollständige Freisetzung der Viren die Zellen mit dem Fachmann bekannten Zellaufschlußmethoden, wie z. B. abwechselndes Einfrieren und Auftauen oder mit Hilfe einer enzymatischen Hydrolyse beispielsweise mit Trypsin (Chiorini, J. A. et al. (1995), *supra*), aufgeschlossen.

10 Ein wesentlicher Nachteil bei der Herstellung von viralen Vektoren mit Hilfe von Helferviren ist das Entstehen einer Mischpopulation aus rekombinanten Viruspartikeln und Helferviren, die weiter gereinigt werden muß. Insbesondere sind Adenovirus-Kontaminationen bei der Verwendung von viralen Vektoren in der Gentherapie wegen der potentiellen Pathogenität zu vermeiden

15 bzw. zu minimieren.

Übliche Verfahren zur Abreicherung bzw. Abscheidung von beispielsweise Adenoviren aus Mischpopulationen mit beispielsweise AAV-Partikeln sind die Dichtegradientenzentrifugation, Hitzeinaktivierung oder eine Kombination

20 beider Methoden. Die Wirkungsweise der Dichtegradientenzentrifugation beruht in diesem Fall auf einem geringfügigen Unterschied in der Dichte der Adenoviren ( $1,35 \text{ g/cm}^3$ ) und der AAV-Partikel ( $1,41 \text{ g/cm}^3$ ), der beispielsweise in der CsCl-Dichtegradientenzentrifugation ausgenutzt werden kann. Aufgrund des geringen Dichteunterschiedes der Viren und der ca. 10- bis

25 100-fach höheren Menge an Adenoviren als an AAV-Partikeln, liegen die Bereiche, in denen sich die AAV-Partikel und die Adenoviren nach der CsCl-Dichtegradientenzentrifugation befinden, sehr nahe, so daß eine quantitative Trennung der beiden Viren durch einen oder mehrere Dichtegradienten nicht möglich ist. Zudem muß sich die Mischpopulation in einem relativ

30 geringen Volumen befinden, da die Dichtegradientenzentrifugation nur mit

relativ wenig Volumen durchgeführt werden kann. Eine routinemäßige Anwendung im industriellen Maßstab ist daher technisch und finanziell nicht möglich. Zudem kann eine quantitative Abscheidung von Adenoviren aus der Mischpopulation nicht erreicht werden.

5

Die Wirkungsweise der Hitzeinaktivierung beruht auf einer unterschiedlichen Thermostabilität von beispielsweise Adenoviren und AAV-Partikeln. Die Erwärmung einer Mischpopulation aus Adenoviren und AAV-Partikeln auf 56-65 °C führt zu einer mehr oder weniger selektiven Hitzeinaktivierung der 10 Adenoviren unter nur geringem Aktivitätsverlust der AAV-Partikel. Nachteil dieser Methode ist jedoch, daß bei der gentherapeutischen Anwendung die noch in der Präparation vorhandenen denaturierten Adenovirus-Proteine eine starke zelluläre Immunantwort beim Patienten hervorrufen können (Smith, C. A. et al. (1996) J. Virol., 70, 6733-6740).

15

Es ist auch bekannt, daß zur Abtrennung viraler Kontaminationen aus biopharmazeutischen Produkten, die frei von Viren sein müssen, Filtermembranen mit einer Porengröße, die eine Abscheiderate von Partikeln im Nanometerbereich gewährleistet, eingesetzt werden können (Scheiblauer, H. et al. (1996), Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Abstract Nr. P54). Scheiblauer et al. (1996, supra) weist zwar darauf hin, daß die Viren aufgrund ihrer Größe zurückgehalten werden, von einer quantitativen Trennung verschiedener Viren wurde jedoch nicht berichtet.

25 Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, ein Verfahren bereitzustellen, bei dem unterschiedliche in einer Mischpopulation enthaltene Viren voneinander getrennt werden können und das auch bei größeren Volumen angewandt werden kann.

Es wurde nun überraschenderweise gefunden, daß eine im wesentlichen quantitative bzw. für die Verwendung in der Gentherapie ausreichende Trennung von Viren unterschiedlicher Größe durch eine oder mehrere Filtrationen einer Virus-enthaltenden Lösung auf eine einfache und auch im 5 industriellen Maßstab anwendbare Weise erreicht wird.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Verfahren zur Trennung von Viren unterschiedlicher Größe, wobei eine Virus-enthaltende Lösung vorzugsweise über eine oder mehrere Filtermembranen filtriert wird.

10

Vorteilhafterweise bestehen die Filtermembranen aus Polyvinylidenfluorid, Polytetrafluormethylen, Polypropylen, modifiziertes oder nicht-modifiziertes Polyethersulfon, Zelluloseacetat, Zellulosenitrat, Polyamid oder regenerierte Zellulose, beispielsweise Cuprammonium-regenerierte Zellulose, vorzugsweise aus Polyvinylidenfluorid. Derartige Membranen mit einer Porengröße, welche die Abscheidung von Partikeln mit einer Größe von ca. 40-400 nm erlauben, sind beispielsweise die Ultipor Membranen der Fa. Pall GmbH, 63303 Dreieich, mit einer Porenweite von ca. 50 nm oder ca. 100 nm, die Asahi Chemical's Bemberg Microporous Membranen der Fa. Asahi Chemical 15 Industry Ltd., Tokio, Japan, mit einer Porenweite von ca. 15 nm, ca. 35 nm oder ca. 72 nm, oder entsprechende Membranen der Fa. Sartorius AG, 37075 Göttingen oder Schleicher und Schuell GmbH, 37582 Dassel. Im allgemeinen haben die Filtermembranen gemäß der vorliegenden Erfindung eine Porenweite, die die Abscheidung von Partikeln von bis zu ca. 120 nm, 20 insbesondere von bis zu ca. 60 nm, vor allem von bis zu ca. 50 nm, vorzugsweise von ca. 25-60 nm erlaubt. Die Auswahl eines Filters mit geeigneter Porenweite richtet sich in erster Linie nach der Größe der zu trennenden Viren, die im allgemeinen einen Durchmesser von bis zu ca. 250 nm, vorzugsweise bis zu ca. 120 nm, insbesondere bis zu ca. 60 nm 25 besitzen. Ein weiteres Auswahlkriterium bei der Auswahl eines Filters mit 30

geeigneter Porenweite ist der Größenunterschied der zu trennenden Viren, der im allgemeinen mindestens ca. 5 nm, vorzugsweise mindestens ca. 10 nm, insbesondere mindestens ca. 20 nm, vor allem mindestens ca. 30 nm und am meisten bevorzugt ca. 40 nm betragen soll. Anhand der Größe der zu trennenden Viren und dem daraus resultierenden Größenunterschied kann der Fachmann einen Filter mit einer zur Trennung der zu trennenden Viren geeigneten Porengröße auswählen. Die Wirksamkeit des oder der ausgewählten Filter kann dann leicht anhand von einfachen Filtrationsexperimenten routinemäßig getestet werden.

10

So eignet sich beispielsweise ein Filter mit einer Porenweite, die eine Titerreduktion von Viren mit einem Durchmesser von über ca. 50 nm ermöglicht, vorzugsweise die oben bereits erwähnte Pall-Ultipor VF DV50 Membran oder die Asahi-Planova 35-Membran, besonders vorteilhaft zur Trennung von rAAV-Partikeln und Adenoviren. Insbesondere diese Filter ermöglichen nicht nur die im wesentlichen quantitative Abscheidung infektiöser Adenoviren aus der Mischpopulation, sondern auch eine hohe Ausbeute an rAAV-Partikeln von ca. 70-90%.

20 Die Begriffe "Porenweite", "Abscheiderate", "Wirkgröße" oder "Porenweite, die eine Abscheidung von Partikeln mit einer bestimmten Mindestgröße erlauben", die von verschiedenen Filterherstellern verwendet werden, sind im Sinne der vorliegenden Erfindung äquivalente Begriffe.

25 Der Begriff Virus bzw. Viren umfaßt im Sinne der vorliegenden Erfindung nicht nur natürlich vorkommende Viren oder gentechnisch veränderte, sogenannte rekombinante Viren, sondern auch Virus-Partikel, d. h. infektiöse wie auch nicht-infektiöse Viren, virus-ähnliche Partikel ("VLP"), wie z. B. Papillomavirus-ähnliche Partikel gemäß WO 96/11272, und Capside, die Nukleinsäuren enthalten, aber auch leer sein können und Teile davon, ins-

besondere eine oder mehrere, vorzugsweise mehrere Untereinheiten bzw. Capsomere, vor allem wenn mehrere Capsomere derart assoziiert bzw. verbunden sind, daß sie mindestens ca. 50%, vorzugsweise mindestens ca. 80%, vor allem ca. 90% des Capsids ausmachen. Die Viren haben vor 5 allem eine im wesentlichen kugelige Form, insbesondere mit Ikosaeder-Symmetrie.

Gemäß der vorliegenden Erfindung können die Viren nach ihrer Größe in folgende drei Gruppen eingeteilt werden:

10

Die erste Gruppe repräsentiert Viren mit einem Durchmesser bis zu ca. 60 nm, die sich im allgemeinen beispielsweise von Flaviviridae mit einem Durchmesser von ca. 40-60 nm, wie z. B. Flavivirus oder Hepatitis C Virus (HCV) ableiten, von Papillomaviren mit einem Durchmesser von ca. 15 55 nm, wie z. B. die humanen Papillomaviren 16 oder 18 (HPV 16, HPV 18), von Papovaviren mit einem Durchmesser von ca. 45 nm, wie z. B. das Polyomavirus, von Hepadnaviren mit einem Durchmesser von ca. 22-42 nm, wie z. B. das Hepatitis B Virus (HBV), von Picornaviren mit einem Durchmesser von ca. 22-30 nm, wie z. B. Hepatitis A Virus (HAV) oder 20 Poliovirus, oder von Parvoviren mit einem Durchmesser von ca. 18-26 nm, wie z. B. Adenoassozierter Virus (AAV) oder rAAV-Partikel mit einem Durchmesser von ca. 25 nm.

Die zweite Gruppe repräsentiert Viren mit einem Durchmesser von ca. 60 25 nm bis zu ca. 120 nm, die sich im allgemeinen beispielsweise von Influenzaviren mit einem Durchmesser von ca. 80-120 nm ableiten, von Retroviren mit einem Durchmesser von ca. 80-120 nm, wie z. B. Onkoviren, Lentiviren, wie beispielsweise HIV-1 oder HIV-2, Spumaviren oder HTLV-Viren, von Adenoviren mit einem Durchmesser von ca. 65-90 nm, von Reoviren

mit einem Durchmesser von ca. 60-80 nm, wie z. B. Coltivirus oder Rotavirus, oder von Togaviren mit einem Durchmesser von ca. 60-70 nm.

Die dritte Gruppe repräsentiert Viren mit einem Durchmesser von ca. 120

5 nm bis zu ca. 250 nm, die sich im allgemeinen beispielsweise von Paramyxoviren mit einem Durchmesser von ca. 150-250 nm ableiten oder von Herpesviren mit einem Durchmesser von ca. 120-200 nm, wie z. B. HSV-1 oder HSV-2, CMV oder EBV.

10 Gemäß der vorliegenden Erfindung lassen sich die Viren aus einer der oben genannten Gruppen besonders vorteilhaft von Viren aus den anderen Gruppen trennen. Es lassen sich aber auch unterschiedliche Viren, die ein und derselben der oben genannten Gruppen angehören, voneinander trennen, sofern ein ausreichender Größenunterschied, vorzugsweise wie oben bereits

15 näher beschrieben, vorhanden ist. Insbesondere lassen sich die Viren aus der ersten Gruppe von den Viren aus der zweiten und/oder dritten Gruppe trennen, vor allem lassen sich AAV-Partikel besonders vorteilhaft von Adenoviren und/oder Herpesviren trennen.

20 Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht beispielsweise in besonders vorteilhafter Weise die Abscheidung von Adenoviren sowohl im Falle von z. B. durch eine oder mehrere Dichtegradienten vorgereinigtes als auch von nicht gereinigtem Material aus den Überständen beispielsweise einer rAAV Kultur, wobei die Adenoviren im Retentat verbleiben und die rAAV-Partikel

25 sich im Filtrat befinden. Vorteilhafterweise wird vor der eigentlichen Trennung der gewünschten Viren eine Vorfiltration, wie unten näher beschrieben, durchgeführt.

30 Eine weitere bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erstreckt sich daher auf eine Vorreinigung der Virus-enthaltenden Lösung,

beispielsweise über einen oder mehrere Dichtegradienten und/oder über eine oder mehrere Vorfiltrationen. Besonders bevorzugt ist eine Vorreinigung mit Hilfe eines oder mehrerer Membranfilter, die die zu trennenden Viren passieren lassen, größere Verunreinigungen jedoch zurückhalten. Durch die 5 Vorreinigung wird im allgemeinen eine Verstopfung des Filters, der die anschließende Trennung der gewünschten Viren bewirkt, durch Bestandteile der Viruskultur, die auch durch Zentrifugation bei niedriger Drehzahl nicht bzw. nicht ausreichend zu entfernen sind, verhindert bzw. erschwert. Hierbei besitzt der Membranfilter zur Vorreinigung beispielsweise von Viren aus der 10 oben genannten ersten Gruppe eine Porenweite von mindestens ca. 60 nm, zur Vorreinigung von Viren aus der ersten und/oder zweiten Gruppe eine Porenweite von mindestens ca. 120 nm bzw. zur Vorreinigung von Viren aus der ersten, zweiten und/oder dritten Gruppe eine Porenweite von mindestens ca. 250 nm. Beispielsweise ist ein Membranfilter mit einer Porenweite 15 von ca. 100 nm, wie z. B. der Ultipor N<sub>66</sub>-Filter (Pall GmbH, 63303 Dreieich), besonders gut geeignet zur Vorreinigung einer Mischpopulation aus rAAV-Partikeln und Adenoviren.

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform wird der pH-Wert der Virus- 20 enthaltenden Lösung mit Hilfe geeigneter Puffer, beispielsweise Tris·Cl-Puffer (Tris(hydroxymethyl)aminomethan), auf ca. 6-10, vorzugsweise auf ca. 7,0-8,5, insbesondere auf ca. 8,0 eingestellt, wodurch beispielsweise die Ausbeuten vorzugsweise an AAV erhöht werden können. Es ist auch besonders bevorzugt, wenn die Virus-enthaltende Lösung zusätzlich Protein bzw. 25 Polypeptid, z. B. in Form von fötalem Kälberserum (FCS) oder Serumalbumin, enthält, wobei die Art bzw. Herkunft des Proteins nicht wesentlich ist. Der Anteil an Protein, z.B. in Form von FCS, beträgt im allgemeinen nicht mehr als ca. 30% (v/v), vorzugsweise ca. 15% (v/v), insbesondere ca. 10% (v/v).

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden mindestens ca. 1-10 ml, vorzugsweise ca. 2-5 ml, insbesondere ca. 3 ml der Virus-enthaltenden Lösung pro ca. 1 cm<sup>2</sup> Filteroberfläche, vor allem nicht mehr als ca. 2-2,5 ml Lösung pro ca. 1 cm<sup>2</sup> Filteroberfläche filtriert. Hierdurch wird im allgemeinen eine hohe Ausbeute beispielsweise der rAAV-Partikel bei gleichzeitiger Abscheidung beispielsweise der Adenoviren erreicht. Insbesondere ist es bevorzugt, vor der eigentlichen Trennung Zellbestandteile in der Viruskultur durch Zentrifugation bei niedriger Umdrehungszahl, beispielsweise bis zu ca. der 1000fachen Erdbeschleunigung (1000g), vorzugsweise bis zu ca. 500g, insbesondere bis zu ca. 300g, abzutrennen. Darüberhinaus ist es vorteilhaft, anschließend eine oben bereits näher beschriebene Vorfiltration durchzuführen. Auf diese Weise konnte beispielsweise nach Abtrennung der Zellbestandteile bei ca. 300g und Vorfiltration der Mischpopulation über einen Membranfilter mit einer Porengröße von ca. 100 nm die Kapazität eines Filters mit einer Porengröße von ca. 50 nm zu 2 ml/cm<sup>2</sup> Filteroberfläche bestimmt werden. Mit Kapazität im Sinne der vorliegenden Erfindung ist das Volumen gemeint, das pro Flächeneinheit Filteroberfläche eine hohe Ausbeute an den gewünschten Viren gewährleistet.

20

Die Vorteile des erfindungsgemäßen Verfahrens sind vor allem eine einfache, kostengünstige und daher auch im industriellen Maßstab anwendbare Trennung von Viren unterschiedlicher Größe unter besonders schonenden Bedingungen, wodurch in besonders vorteilhafter Weise eine hohe Ausbeute von gereinigten Viren erhalten wird. Ein weiterer Vorteil der vorliegenden Erfindung ist es, daß die erfindungsgemäß gereinigten Viren beispielsweise direkt als virale Vektoren für die Gentherapie eingesetzt werden können, da sie ausreichend frei von anderen, beispielsweise pathogenen Viren sind. So konnte beispielsweise in einer nach dem erfindungsgemäßen Verfahren gereinigten rAAV-enthaltenden Lösung keine Adenoviren anhand eines

Replikationstestes, bei dem die Entstehung eines zytopathischen Effekts bei permissiven Zellen innerhalb eines Zeitraumes von beispielsweise 14 Tagen nach Koinkubation mit einer entsprechenden Lösung auf die Anwesenheit von infektiösen Adenoviren hinweisen würde, nachgewiesen werden. Auch konnten mit Hilfe der PCR-Reaktion und DNA-Hybridisierung eine Reduktion adenoviraler Nukleinsäuren um einen Faktor von mindestens ca.  $3 \times 10^3$ , vorzugsweise um das ca.  $10^3$ - $10^4$ fache nachgewiesen werden. Der im Filtrat verbleibende geringe Restanteil adenoviraler DNA ist jedoch nicht mit replikationskompetenten Adenoviren assoziiert und somit unschädlich. Die Verringerung adenoviraler Bestandteile, wie z. B. freie Adenovirus-Proteine und subvirale Partikel, war besonders überraschend, da diese Bestandteile durchaus eine unspezifische Immunantwort bei der Anwendung viraler Vektoren in der Gentherapie am Patienten auslösen können und folglich die Therapie in Frage stellen könnten. Die Titerreduktion, d. h. der Faktor der Verminderung des Titers der abzutrennenden Viren, betrug beispielsweise bei Adenoviren gemäß dem erfundungsgemäßen Verfahren mehr als log9, d. h. nach der erfundungsgemäßen Filtration einer Mischpopulation aus rAAV-Partikeln und  $10^9$  Adenoviren, wurde kein Adenovirus im Filtrat nachgewiesen.

20

Die folgenden Beispiele soll die Erfindung näher erläutern, ohne sie darauf zu beschränken:

25 Beispiele**Beispiel 1**

Filtration einer Mischpopulation aus rAAV-Partikeln und Adenoviren

30

1.1 Es wurde eine Mischpopulation von rAAV Typ 2-Partikeln, die als Transgen das für T-Zellen kostimulierende Protein B7-2 kodierende Gen enthalten, und Wildtyp Adenovirus Typ 5 nach der Vorschrift von Chiorini, J. A. et al. (1995, *supra*) hergestellt, wobei 3 Tage nach der Infektion mit den Adenoviren, die Zellen, die bereits einen starken zytopatischen Effekt zeigen, einschließlich des Überstandes gesammelt wurden. Anschließend wurden die Zellen mit Überstand durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen aufgeschlossen. Unlösliche Zellbestandteile wurden durch eine 10minütige Zentrifugation bei 300 g abgetrennt. Anschließend wurde der Anteil an fötalem Kälberserum (FCS) auf 10% eingestellt und zu der Präparation Tris-Cl-Puffer (pH 8,0) bis zu einer Endkonzentration von 100mM gegeben. Die von unlöslichen Zellbestandteilen abgetrennte und eingestellte Präparation wurde mit 2,5 bar auf ein Filtersystem beaufschlagt, das eine Pall-Ultipor N<sub>66</sub>-Membran (Fa. Pall GmbH, 63303 Dreieich) mit einer Wirkgröße von 0,1 µm als Vorfilter sowie eine Pall-Ultipor VF DV50-Membran zur Trennung der beiden Viren enthält. Auf diese Weise wurden nicht mehr als 2 ml der Präparation pro 1 cm<sup>2</sup> Filteroberfläche filtriert.

1.2 Ausgangsmaterial war der Zellkulturüberstand von rAAV-Partikeln nach dem Protokoll von Chiorini, J. A. et al. (1995, *supra*). Drei bis vier Tage nach Infektion der Zellen mit dem Adenovirus wurden die Zellen mitsamt des Überstandes vereinigt. Zu der Präparation wurde Tris-Cl-Puffer (pH 8,0) zu einer Endkonzentration von 30 mM gegeben. Die Suspension wurde zum Aufbrechen der Zellen dreimal eingefroren und aufgetaut. Der Schritt der Aufkonzentration der Viren durch eine CsCl-Dichtegradientenkonzentration wurde im Anschluß an die Filtration durchgeführt.

Die Präparation wurde auf ein Filtersystem beaufschlagt, das aus einem Vorfilter und aus einem Planova 35-Hohlfaser-Filtrationselement mit einer Wirkgröße von 35 nm besteht. Der Vorfilter wurde mit einem Druck von 1,5 bar, der Planova 35-Filter mit einem Druck von 0,5 bar beaufschlagt. Die Menge des filtrierten Volumens betrug beim Vorfilter höchstens 2,5 ml pro  $\text{cm}^2$  Filteroberfläche und beim Planova 35-Filter höchstens 7 ml pro  $\text{cm}^2$  Filteroberfläche.

## Beispiel 2

10

### Replikationstest

I. Ein Teil einer rAAV-Präparation wurde wie in Beispiel 1 mit einem Filtersystem, das  $5 \text{ cm}^2$  Filteroberfläche hat, filtriert. Die Filtrate wurden in mehreren Aliquots zu 1,5 ml gesammelt. Ein Kontroll-Aliquot verblieb unfiltriert. Von den filtrierten Aliquots sowie von der unfiltrierten Kontrolle wurden jeweils sieben 1:10-Verdünnungsstufen hergestellt. Für den Replikationstest wurden HeLa-Zellen in 48-Napf-Platten als konfluente Zellschicht angewachsen. Der Überstand wurde aus den Näpfen bis auf 100  $\mu\text{l}$  Restvolumen abgezogen. Von der Verdünnungsreihe eines jeden filtrierten Aliquots sowie von der unfiltrierten Kontrolle wurden jeweils 100  $\mu\text{l}$  in je einen Napf überführt. Nach 3 h Adsorption der Viren an die Zellen wurden 500  $\mu\text{l}$  Vollmedium zugegeben. Über einen Zeitraum von einer Woche wurde täglich kontrolliert, ob sich ein zytopathischer Effekt (CPE) zeigt. Bei Bedarf wurde das Medium gewechselt. Der CPE würde durch die Replikation der Viren in den HeLa-Zellen bewirkt. Letztlich endet die Replikation mit dem Tod der infizierten Zelle und mit der Freisetzung der Nachkommenviren.

Tabelle 1 zeigt ein typisches Ergebnis. Während bei der unfiltrierten Kontrolle bis zur 4. Verdünnungsstufe ein CPE nachweisbar war, war die Zellschicht bei allen untersuchten filtrierten Aliquots nach 7 Tagen intakt. Dies bedeutet bei dem unfiltrierten Material einen Titer infektiöser Adenoviren von großenordnungsmäßig  $10^5$ /ml, während sich in dem filtrierten Material kein infektiöses Adenovirus mehr befindet. Ein vergleichbarer Titer war im Retentat, also in dem Material, das sich direkt über der Membran befand und gesammelt wurde, nachweisbar.

10

Tabelle 1

Ausbildung eines zytopathischen Effekts 7 Tage nach Koinkubation von HeLa-Zellen mit filtrierten und unfiltrierten Verpackungsüberständen

15

20

25

Probe	Experi- ment	Verdünnungsstufe							
		0	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
<b>Kontrolle</b>	1	+	+	+	+	+	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	-	-	-
<b>Aliquot 1</b>	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Aliquot 2</b>	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Aliquot 3</b>	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Retentat</b>	1	+	+	+	+	+	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	-	-	-

II. Von einer Adenovirus-Präparation, die mit einer Cäsiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation aufkonzentriert wurde, wurde der Adenovirus-Titer, wie oben beschrieben, bestimmt. Es wurden gemäß dieser Titerbestimmung  $10^8$  Adenoviren/ml in MEM-Medium mit 10 % FCS und 50 mM Tris·Cl (pH 8,0) aufgenommen. Von dieser Adenovirus-Suspension wurden 10 ml mit einem in Beispiel 1 beschriebenen Filtersystem behandelt, d. h. es wurden insgesamt  $10^9$  infektiöse Adenoviren appliziert. Die resultierenden 10 ml Filtrate wurden auf eine  $175 \text{ cm}^2$ -Kulturfläche mit 80 % konfluenten HeLa-Zellen verbracht. Die Flasche wurde 5 Tage inkubiert. Nach diesem Zeitraum zeigte sich kein CPE. Da die Zellen zu diesem Zeitpunkt konfluent waren und da eine längere Versuchsdauer angestrebt wurde, wurden sie 1:5 gesplittet. Die fünf resultierenden HeLa-Kulturen wurden dann über einen weiteren Zeitraum von 5 Tagen beobachtet. Es zeigte sich nach wie vor kein CPE. Daraus wurde auf eine vollständige Abwesenheit von infektiösen Adenoviren im Filtrat geschlossen.

### Beispiel 3

#### Nachweis adenoviraler Nukleinsäuren

20

##### a) RT-PCR-Reaktion

Eine rAAV-Teilpräparation wurde wie in Beispiel 1 geschildert filtriert; ein Teil verblieb zur Kontrolle unfiltriert. Es wurden jeweils  $3 \times 10^6$  Zellen der 25 Melanomzelllinie M3HK auf einer  $75 \text{ cm}^2$ -Zellkulturflasche angewachsen. Vier derartige Flaschen wurden vorbereitet und einer Röntgenstrahlung von 50 Gy ausgesetzt. Die Röntgenstrahlung förderte die rAAV-vermittelte Fremdgenexpression sehr stark. Das Medium wurde jeweils abgezogen und in jede Flasche wurden 1,5 ml Vollmedium ohne Serum gegeben. Zusätzlich wurden 30 dann in eine der Flaschen 0,5 ml des unfiltrierten Kontroll-Überstandes, in

zwei der Flaschen jeweils 0,5 ml von zwei filtrierten Aliquots und in eine Flasche Medium als Negativkontrolle gegeben. Nach 3 Tagen Inkubation bei 37°C und 10 % CO<sub>2</sub> wurden aus dem Zellmaterial jeder Flasche eine RNA-Präparation (Chomchinski, P. und Sacchi, N., Anal. Biochem. 162, 5 156-159, 1987) durchgeführt. Die RNA-Präparation wurde einer semiquantitativen RT-PCR-Reaktion unterzogen. Zum Nachweis adenoviraler Transkripte sowie des ubiquitäten  $\beta$ -Aktin-Transkriptes wurden die von Cotten und Mitarbeitern beschriebenen Primerpaare (Cotten, M., Virology, 205, 254-261, 1994) verwendet.

10

Während bei der unfiltrierten Kontrolle das adenovirale E1A-Transkript in vier von 5 Verdünnungsstufen nachweisbar war, konnte dieses Transkript in den mit den filtrierten Aliquots sowie bei der Negativkontrolle nicht nachgewiesen werden.  $\beta$ -Aktin-Transkripte waren dagegen in allen Parallelen 15 nachweisbar.

b) DNA-Hybridisierung

20 Ausgangsmaterial war eine wie in Beispiel 1 beschriebene filtrierte rAAV-Präparation sowie zur Kontrolle ein unfiltriert belassener Anteil davon. Zu den filtrierten Aliquots sowie der unfiltrierten Kontrolle wurden Tris·Cl (pH 7,8) bis zu einer Endkonzentration von 0,01 M, EDTA bis zu einer Endkonzentration von 0,005 M und SDS bis zu einer Endkonzentration von 25 0,5 % sowie Proteinase K bis zu einer Endkonzentration von 20 mg/ml zugegeben und 20 min bei 56°C inkubiert.

50  $\mu$ l der Proteinase K-behandelten Proben wurden zur Denaturierung in 200  $\mu$ l 0,5 N NaOH aufgenommen. Hiervon wurden acht 1:10-Verdünnungen in 30 0,5 N NaOH hergestellt. Zusätzlich wurde als Standard von einer bekannte

Menge eines Plasmides mit der zu detektierenden DNA-Sequenz in analoger Weise eine Verdünnungsreihe hergestellt. Die Verdünnungsreihen wurden auf eine Nylonmembran aufgedottet. Die Membran wurde bei 80°C zur kovalenten Bindung der DNA inkubiert und danach einer Southern-Hybridisierung 5 mit einer für Adenovirus-DNA spezifischen markierten Probe unterzogen (Chiorini, J. A. et al. (1995), *supra*). Als Probe wurde ein Digoxigenin-markiertes Restriktionsfragment mit dem E1A-Gen des Adenovirus verwendet. Die Adenovirus-E1A-DNA auf der Nylonmembran wurde mittels immunologischem Digoxigenin-Nachweis (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim) 10 sichtbar gemacht. In der kleinsten Verdünnungsstufe des E1A-Kontrollplasmides wurden  $2 \times 10^8$  einzelsträngige DNA-Moleküle aufgetragen. Die kleinste Verdünnungsstufe der unfiltrierten Kontrolle, bei der Material nachweisbar ist, zeigte absolut etwa  $5 \times 10^9$  Adenovirus-Genome. Dies würden etwa  $1 \times 10^{10}$  Genome/ml in der AAV-Präparation entsprechen. Bei den filtrierten 15 Aliquots ist in den meisten Fällen in der kleinsten Verdünnungsstufe ein schwaches Signal zu erkennen, das gegenüber der unfiltrierten Kontrolle etwa um einen Faktor  $3 \times 10^3$  bis  $1 \times 10^4$  schwächer ist und  $1 \times 10^7$  bis  $3 \times 10^7$  Genome/ml der AAV-Präparation repräsentieren würde. Die in Beispiel 20 2 geschilderten Tests zeigten jedoch, daß diese Genome in den filtrierten Aliquots nicht mit infektiösen Partikeln assoziiert, sondern in nicht-infektiöser Form vorliegen. Durch die Filtrationstechnik wurde eine Abreicherung dieser Adenovirus-Genome um einen Faktor  $3 \times 10^3$  bis  $1 \times 10^4$  erzielt.

25 **Beispiel 4**

Nachweis des adenoviralen Strukturproteins IX im Western-Blot

Das Fehlen des adenoviralen Strukturproteins IX im Filtrat wurde mit 30 spezifischen Antikörpern im Western-Blot nachgewiesen. Von filtrierten

Aliquots sowie von unfiltrierten Kontrollen wie auch von Adenovirus-Präparationen wurden jeweils 2  $\mu$ l zusammen mit Gelauftragspuffer in eine Spur eines Proteingels geladen. Das Material wurde elektrophoretisch getrennt (Laemmli, U. K., Nature 227, 680-685, 1970) und auf eine Nitrozellulose-membran elektrogeblottet. Der Western-Blot wurde mit dem für das Adenovirus-Strukturprotein IX spezifischen Kaninchen-Antiserum inkubiert. Spezifische Banden wurden mit Standard-Techniken sichtbar gemacht. Es zeigte sich, daß das Strukturprotein IX durch die Filtration abgetrennt wurde.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Trennung von Viren unterschiedlicher Größe, dadurch gekennzeichnet, daß eine Virus-enthaltende Lösung filtriert wird.

5

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Virus-enthaltende Lösung über eine oder mehrere Filtermembranen filtriert wird.

10 3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Filtermembran aus Polyvinylidenfluorid, Polytetrafluormethylen, Polypropylen, modifiziertes oder nicht-modifiziertes Polyethersulfon, Zelluloseacetat, Zellulosenitrat, Polyamid, oder regenerierte Zellulose, beispielsweise Cuprammonium-regenerierte Zellulose, vorzugsweise aus Polyvinylidenfluorid besteht.

15 4. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß der oder die Filtermembranen eine Porenweite von höchstens bis zu ca. 120 nm, insbesondere von höchstens bis zu ca. 60 nm, vor allem von höchstens bis zu ca. 50 nm, vorzugsweise von ca. 25-60 nm besitzt.

20 5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß die Viren eine Größe von bis zu ca. 250 nm, vorzugsweise bis zu ca. 120 nm, insbesondere bis zu ca. 70 nm, vor allem bis zu ca. 60 nm besitzen.

25 6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-5, dadurch gekennzeichnet, daß der Größenunterschied der zu trennenden Viren mindestens ca. 5 nm, vorzugsweise mindestens ca. 10 nm, insbesondere mindestens ca. 20

nm, vor allem mindestens ca. 30 nm und am meisten bevorzugt ca. 40 nm beträgt.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-6, dadurch gekennzeichnet, daß die Viren eine im wesentlichen kugelige Form, insbesondere mit Ikosaeder-Symmetrie besitzen.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-7, dadurch gekennzeichnet, daß die Viren ausgewählt sind aus einer ersten Gruppe von Viren mit einem Durchmesser bis zu ca. 60 nm, aus einer zweiten Gruppe von Viren mit einem Durchmesser von ca. 60 nm bis zu ca. 120 nm und/- oder einer dritten Gruppe von Viren mit einem Durchmesser von ca. 120 nm bis zu ca. 250 nm.
9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Viren aus der ersten Gruppe abgeleitet sind von Flaviviridae, Papillomaviren, Papovaviren, Hepadnaviren, Picornaviren oder Parvoviren, insbesondere von AAV.
10. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Viren aus der zweiten Gruppe abgeleitet sind von Influenzaviren, Retroviren, Adenoviren, Reoviren oder Togaviren, insbesondere von Adenoviren.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 8-10, dadurch gekennzeichnet, daß die Viren aus der dritten Gruppe abgeleitet sind von Paramyxoviren oder Herpesviren, insbesondere von Herpesviren.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-11, dadurch gekennzeichnet, daß die Virus-enthaltende Lösung vorgereinigt wird.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-12, dadurch gekennzeichnet, daß die genannte Vorreinigung über einen oder mehrere Dichtegradienten und/oder über eine oder mehrere Vorfiltrationen erfolgt.
- 5 14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß bei der genannten Vorfiltration ein oder mehrere Membranfilter verwendet werden.
- 10 15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß der oder die Membranfilter zur Vorreinigung von Viren aus der ersten Gruppe gemäß Anspruch 8 oder 9 eine Porenweite von mindestens ca. 60 nm, zur Vorreinigung von Viren aus der ersten und/oder zweiten Gruppe gemäß einem der Ansprüche 8-10 mindestens ca. 120 nm und zur Vorreinigung von Viren aus der ersten, zweiten und/oder dritten Gruppe gemäß einem der Ansprüche 8-11 mindestens ca. 250 nm besitzen.
- 15 16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-15, dadurch gekennzeichnet, daß der pH-Wert der Virus-enthaltenden Lösung ca. 6-10, vorzugsweise ca. 7.0-8.5, insbesondere ca. 8,0 beträgt.
- 20 17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-16, dadurch gekennzeichnet, daß die Virus-enthaltende Lösung zusätzlich Protein enthält.
18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß die genannte Lösung Protein in Form von fötalem Kälberserum oder Serumalbumin enthält.
- 25 19. Verfahren nach Anspruch 17 oder 18, dadurch gekennzeichnet, daß der Anteil am Protein nicht mehr als ca. 30% (v/v), vorzugsweise ca. 15% (v/v), insbesondere ca. 10% (v/v) beträgt.

20. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-19, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens ca. 1-10 ml Lösung pro ca. 1 cm<sup>2</sup> Filteroberfläche, vorzugsweise ca. 2-5 ml Lösung pro ca. 1 cm<sup>2</sup> Filteroberfläche, insbesondere nicht mehr als ca. 2-2,5 ml Lösung pro ca. 1 cm<sup>2</sup> filtriert werden.

-25-

**GEÄNDERTE ANSPRUCHE**

[beim Internationalen Büro am 6. August 1998 (06.08.98) eingegangen;  
ursprüngliche Ansprüche 1 und 20 geändert; alle weiteren Ansprüche  
unverändert (2 Seiten)]

1. Verfahren zur Trennung von Viren unterschiedlicher Größe, dadurch gekennzeichnet, daß ca. 1-10 ml pro ca. 1 cm<sup>2</sup> Filteroberfläche einer Virus-enthaltenden Lösung filtriert wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Virus-enthaltende Lösung über eine oder mehrere Filtermembranen filtriert wird.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Filtermembran aus Polyvinylidenfluorid, Polytetrafluormethylen, Polypropylen, modifiziertes oder nicht-modifiziertes Polyethersulfon, Zelluloseacetat, Zellulosenitrat, Polyamid, oder regenerierte Zellulose, beispielsweise Cuprammonium-regenerierte Zellulose, vorzugsweise aus Polyvinylidenfluorid besteht.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß der oder die Filtermembranen eine Porenweite von höchstens bis zu ca. 120 nm, insbesondere von höchstens bis zu ca. 60 nm, vor allem von höchstens bis zu ca. 50 nm, vorzugsweise von ca. 25-60 nm besitzt.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß die Viren eine Größe von bis zu ca. 250 nm, vorzugsweise bis zu ca. 120 nm, insbesondere bis zu ca. 70 nm, vor allem bis zu ca. 60 nm besitzen.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-5, dadurch gekennzeichnet, daß der Größenunterschied der zu trennenden Viren mindestens ca. 5 nm,

**GEÄNDERTES BLATT (ARTIKEL 19)**

-26-

19. Verfahren nach Anspruch 17 oder 18, dadurch gekennzeichnet, daß der Anteil am Protein nicht mehr als ca. 30% (v/v), vorzugsweise ca. 15% (v/v), insbesondere ca. 10% (v/v) beträgt.
- 5 20. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-19, dadurch gekennzeichnet, daß ca. 2-5 ml Lösung pro ca. 1 cm<sup>2</sup> Filteroberfläche, insbesondere nicht mehr als ca. 2-2,5 ml Lösung pro ca. 1 cm<sup>2</sup> filtriert werden.

**GEÄNDERTES BLATT (ARTIKEL 19)**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interr. nat Application No  
PCT/EP 98/01257

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 6 C12N7/02 //C12N15/86, A61K48/00

According to International Patent Classification(IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE 19 51 800 A (ZANDER HELMUT) 29 April 1971 see the whole document ---	1-20
X	A. MAYR ET AL: "Virologische Arbeitsmethode" 1974, VEB GUSTAV FISCHER VERLAG XP002070257 see page 258 - page 259 ---	1-20
X	BINIE A. VER ET AL: "Efficient filtration and sizing of viruses with membrane filters" JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 2, no. 1, 1968, pages 21-25, XP002070256 see the whole document ---	1-20 -/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

3 July 1998

20/07/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Fernandez y Branas, F

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/EP 98/01257

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	WO 97 08298 A (GENZYME CORP ;RIORDAN CATHERINE E O (US); ERICKSON AMY E (US); SMI) 6 March 1997 see page 35 see page 18, line 4 - line 10 ----	1
A	DE 471 105 C (ERNST FRIEDBERGER) 1929 see the whole document ----	1-20
A	WO 89 08701 A (INST ANGEWANDTE BIOTECHNOLOGIE) 21 September 1989 see the whole document ----	1-20
A	WO 96 26742 A (UNIV CALIFORNIA ;HAMMOND H KIRK (US); GIORDANO FRANK J (US); DILLM) 6 September 1996 see page 14, line 10 - page 15, line 5 ----	1-20
A	WO 95 06743 A (UAB RESEARCH FOUNDATION) 9 March 1995 see page 49, line 1 - page 50, line 17 ----	1-20
A	MUZYCZKA N: "USE OF ADENO-ASSOCIATED VIRUS AS A GENERAL TRANSDUCTION VECTOR FOR MAMMALIAN CELLS" CURRENT TOPICS IN MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY, vol. 158, 1992, pages 97-129, XP000647517 see the whole document -----	1-20

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Interr. Nat Application No

PCT/EP 98/01257

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
DE 1951800	A 29-04-1971	NONE		
WO 9708298	A 06-03-1997	AU 7010896 A EP 0847442 A		19-03-1997 17-06-1998
DE 471105	C	NONE		
WO 8908701	A 21-09-1989	DE 3833925 A EP 0357738 A JP 2503865 T		21-09-1989 14-03-1990 15-11-1990
WO 9626742	A 06-09-1996	AU 5028796 A AU 5457096 A CA 2188575 A EP 0760682 A JP 10501423 T		18-09-1996 31-10-1996 06-09-1996 12-03-1997 10-02-1998
WO 9506743	A 09-03-1995	AU 7565694 A		22-03-1995

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 6 C12N7/02 //C12N15/86, A61K48/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 6 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DE 19 51 800 A (ZANDER HELMUT) 29. April 1971 siehe das ganze Dokument ---	1-20
X	A. MAYR ET AL: "Virologische Arbeitsmethode" 1974, VEB GUSTAV FISCHER VERLAG XP002070257 siehe Seite 258 - Seite 259 ---	1-20
X	BINIE A. VER ET AL: "Efficient filtration and sizing of viruses with membrane filters" JOURNAL OF VIROLOGY, Bd. 2, Nr. 1, 1968, Seiten 21-25, XP002070256 siehe das ganze Dokument ---	1-20

 Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchebericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung,

eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"%" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Rechercheberichts

3. Juli 1998

20/07/1998

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Fernandez y Branas, F

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 98/01257

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X,P	WO 97 08298 A (GENZYME CORP ;RIORDAN CATHERINE E O (US); ERICKSON AMY E (US); SMI) 6.März 1997 siehe Seite 35 siehe Seite 18, Zeile 4 - Zeile 10 ----	1
A	DE 471 105 C (ERNST FRIEDBERGER) 1929 siehe das ganze Dokument ----	1-20
A	WO 89 08701 A (INST ANGEWANDTE BIOTECHNOLOGIE) 21.September 1989 siehe das ganze Dokument ----	1-20
A	WO 96 26742 A (UNIV CALIFORNIA ;HAMMOND H KIRK (US); GIORDANO FRANK J (US); DILLM) 6.September 1996 siehe Seite 14, Zeile 10 - Seite 15, Zeile 5 ----	1-20
A	WO 95 06743 A (UAB RESEARCH FOUNDATION) 9.März 1995 siehe Seite 49, Zeile 1 - Seite 50, Zeile 17 ----	1-20
A	MUZYCZKA N: "USE OF ADENO-ASSOCIATED VIRUS AS A GENERAL TRANSDUCTION VECTOR FOR MAMMALIAN CELLS" CURRENT TOPICS IN MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY, Bd. 158, 1992, Seiten 97-129, XP000647517 siehe das ganze Dokument -----	1-20

INTERNATIONALER  RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/01257

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie			Datum der Veröffentlichung
DE 1951800	A 29-04-1971	KEINE			
WO 9708298	A 06-03-1997	AU 7010896 A EP 0847442 A			19-03-1997 17-06-1998
DE 471105	C	KEINE			
WO 8908701	A 21-09-1989	DE 3833925 A EP 0357738 A JP 2503865 T			21-09-1989 14-03-1990 15-11-1990
WO 9626742	A 06-09-1996	AU 5028796 A AU 5457096 A CA 2188575 A EP 0760682 A JP 10501423 T			18-09-1996 31-10-1996 06-09-1996 12-03-1997 10-02-1998
WO 9506743	A 09-03-1995	AU 7565694 A			22-03-1995